

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Antonio Vrselja

**UTJECAJ AKUTNE HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE NA PARAMETRE
OKSIDATIVNOG STRESA KOD
ZDRAVIH SPRAGUE – DAWLEY
ŠTAKORA**

Završni rad

OSIJEK, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Antonio Vrselja

**UTJECAJ AKUTNE HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE NA PARAMETRE
OKSIDATIVNOG STRESA KOD
ZDRAVIH SPRAGUE – DAWLEY
ŠTAKORA**

Završni rad

OSIJEK, 2018.

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor: doc.dr.sc. Ivana Jukić, dr.med.

Rad sadrži: 1 tablicu, 2 slike i 18 stranica.

SADRŽAJ

Popis kratica.....	II
1. <u>UVOD</u>	1
1.1. Slobodni radikali i oksidativni stres.....	1
1.2. Antioksidativni mehanizmi.....	3
1.3. Hiperbarična oksigenacija.....	4
2. <u>HIPOTEZA</u>	6
3. <u>CILJ ISTRAŽIVANJA</u>	7
4. <u>MATERIJALI I METODE</u>	8
4.1. Eksperimetnalni životnjski model.....	8
4.2. Protokoli za izlaganje hiperbaričnom kisiku.....	8
4.3. Mjerenje krvnog tlaka.....	8
4.4. Skupljanje arterijskih uzoraka krvi.....	9
4.5. Mjerenje oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta.....	9
4.6. Statističke metode.....	9
5. <u>REZULTATI</u>	10
5.1. Masa štakora i srednji arterijski tlak.....	10
5.2. Razina oksidativnog stresa (TBARS) i antioksidativnog kapaciteta (FRAP) u serumu.....	10
6. <u>RASPRAVA</u>	12
7. <u>ZAKLJUČAK</u>	13
8. <u>SAŽETAK</u>	14
9. <u>SUMMARY</u>	15
10. <u>LITERATURA</u>	16
11. <u>ŽIVOTOPIS</u>	18

Popis kratica

ROS - engl. reactive oxygen species

RNS - engl. reactive nitrogen species

O₂ –• - superoksidni anion ili superoksid

OH• - hidroksilni radikal

ROO• - peroksilni radikal

H₂O₂ - vodikov peroksid

HClO - hipokloritna kiselina

O₂ - singletni kisik

O₃ - ozon

SOD - superoksid dismutaza

LDL - low density cholesterol

IL - interleukin

NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NO - dušikov oksid

ONOO- - peroksinitrit

HBO₂ - engl. Hyperbaric Oxygen Treatment

TBARS - engl. Thiobarbituric Acid Reactive Substances

FRAP - engl. Ferric Reducing Ability of Plasma

SD - Sprague Dawley

DHE - dihidroetidin

1. UVOD

1.1 Slobodni radikali i oksidativni stres

Stanični metabolizam pretežno ovisi o kisiku, pri čemu je isporuka kisika ključni čimbenik. U normalnim uvjetima kisik se prenosi vezan na hemoglobin (približno 97 %) i otopljen u plazmi (3 %). Povećanjem parcijalnog tlaka kisika, što se događa tijekom hiperbarične oksigenacije, topljivost kisika u plazmi i oksigenacija tkiva se povećava. Međutim, kisik je visoko reaktivna molekula zbog čega, pri visokim parcijalnim tlakovima kao u hiperbaričnoj oksigenaciji, dolazi do formiranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (1). To su kemijske vrste s nesparenim elektronom u vanjskoj orbitali. Nespareni elektron uzrokuje njihovu nestabilnost i reaktivnost, što je rezultat njihova nastojanja da popune valentnu orbitalu i postignu stabilnu elektronsku konfiguraciju.

Oksidativni stres stanje je neravnoteže između produkcije slobodnih kisikovih radikala te njihova uklanjanja putem antioksidanata i enzima (2, 3). U fiziološkim uvjetima oni se neprestano stvaraju u tijelu te su jedan od glavnih oštećenja nukleinskih kiselina, lipida u membranama i proteina u tijelu. Nakon mnogih eksperimenata u laboratorijskim uvjetima (*in vitro*) i eksperimenata na životinjama (*in vivo*), klasična medicina prihvatila je činjenicu da se oksidativni stres dovodi u vezu s nastankom mnogih bolesti. Konkretno, navode se neurodegenerativne bolesti, karcinomi, fibroze i brojne infekcije koje upravo proizlaze iz oksidativnog stresa. Razvijene su brojne laboratorijske metode kojima je moguće izmjeriti ukupnu razinu oksidativnog stresa, utvrditi oksidativni status mjerenjem koncentracije i izražaja antioksidativnih enzima (npr. genski izražaj antioksidativnih enzima (mRNA pomoću rtPCR) i izražajnost proteina pomoću Western Blot metode) ili njihovu aktivnost (spektrofotometrijski), prisutnost ili proizvodnja produkata koji se mogu izmjeriti direktno na tkivima ili stanicama (npr. *in situ* proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS-a) različitim metodama fluorescencije, proizvodnja vodikovog peroksida i peroksinitrita metodom protočne citometrije) (4). U ovom istraživanju bit će primijenjena spektrofotometrijska metoda određivanja ukupne razine oksidativnog stresa (mjerenje produkata lipidne peroksidacije ((TBARS)) i antioksidativnog kapaciteta (FRAP)).

Slobodne radikale istraživao je još davne 1954. godine biogerontolog Denham Harman u vrijeme dok je istraživao proces starenja te je utvrdio da oni nastaju pucanjem veza unutar molekula u stanicama našeg organizma. Do toga dolazi zbog raznih čimbenika, a neki od njih su: pušenje, konzumiranje alkohola, nezdrave namirnice, neuravnotežene fizičke aktivnosti,

izloženost ionizirajućem zračenju, ultraljubičastim zrakama, zagađenom zraku u gradovima i brojni drugi. Nestabilni su zbog manjka elektrona u vanjskoj ljusci te su zbog toga posebno agresivni prema drugim molekulama. Nastaju hemolitičkim cijepanjem kovalentne veze i teže stvaranju veze s okolnim molekulama kako bi ostvarili stabilnost, pri čemu molekula s kojom su reagirali postaje novi slobodni radikal, a sama reakcija postaje lančana. Reakcija se prekida pomoću antioksidansa koji neutraliziraju slobodne radikale tako da im doniraju svoj elektron (5).

Biološki najznačajniji slobodni radikali su: kisikove reaktivne vrste (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) i reaktivne dušikove vrste (engl. *Reactive nitrogen species*, RNS). ROS i RNS su pojmovi koji opisuju radikale i čestice koji nisu radikali, ali imaju oksidativno djelovanje. Veći dio struktura u sastavu ROS-a čine: superoksidni anion ili superoksid ($O_2^{\cdot -}$), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), peroksilni radikal (RO_2^{\cdot}) i alkoksilni radikal (RO^{\cdot}). Reaktivne kisikove vrste koje nisu slobodni radikali su: vodikov peroksid (H_2O_2), hipokloritna kiselina ($HClO$), ozon (O_3) i singletni kisik (O_2). Oni nisu radikali u pravom smislu, ali iz njih vrlo lako mogu nastati radikali (5). ROS se međusobno razlikuju u svojim reaktivnostima i u svojoj toksičnosti. Vodikov peroksid manje je reaktivan od superoksidnog radikala, ali je zato mnogo više toksičan zbog svoje sposobnosti prodiranja kroz biološke membrane. RNS se odnose na molekule nastale od dušikovog monoksida (NO).

U ljudskom organizmu ROS nastaju iz molekularnog kisika djelovanjem UV zračenja ili procesima redukcije oksidativnih enzima. Najveća je količina ROS-a u obliku $O_2^{\cdot -}$ i nastaje svakodnevno u mitohondrijskom lancu za prijenos elektrona. Od ukupnog kisika unesenog u organizam u mitohondrijima se potroši oko 85 % (6). Najučinkovitiji način uklanjanja ROS-a iz organizma enzimski je kataliza. Ovisno o jačini oksidativnog stresa, organizam pokreće mehanizme obrane kojim nastoji povećati broj antioksidansa (male molekule koje mogu izbaciti slobodne radikale prihvatanjem ili doniranjem elektrona) kako bi eliminirali pojedinačna štetna stanja (7).

Svakodnevni način života (stres, fizičko opterećenje, nesanica) utječu na proizvodnju ROS-a. ROS i RNS u fiziološkim (vrlo malim) koncentracijama dio su signalnog procesa koji regulira bitne stanične membranske funkcije. Utječu na intracelularne redoks-sustave te aktivaciju protein-kinaze i drugih posrednika staničnih signalnih struktura. Mala odstupanja od fizioloških vrijednosti ROS-a mogu značajno utjecati na otpornost stanica prema oksidacijskom oštećenju proteina, lipida i DNA. Nastajanje male količine ROS-a dio je normalne fiziologije i ima pozitivan utjecaj na organizam te je važno spomenuti da male

količine ROS-a, koje se stalno proizvode aerobnim procesima, imaju važnu ulogu u nastajanju matičnih stanica (9, 10).

1.2 Antioksidativni mehanizmi

Štetno djelovanje ROS-a u fiziološkim uvjetima zaustavlja antioksidativni obrambeni mehanizam koji se sastoji od malih molekula koje izbacuju slobodne radikale prihvatanjem ili doniranjem elektrona kako bi eliminirali štetna stanja. Inhibicija stvaranja ROS-a, povećanje endogene antioksidativne generacije i istjerivanje ROS-a i njihovih prekursora samo su neki od mehanizama djelovanja antioksidansa (3).

Postoji enzimska i neenzimska antioksidativna obrana. Enzimska antioksidativna obrana uključuje superoksid dismutazu (SOD), glutathion peroksidazu i katalazu. Neenzimska antioksidativna obrana uključuje vitamin C, vitamin E, karotenoide i flavonoide (8). Glutathion peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza prva su linija obrane protiv stanične oksidacije. Vitamin C i E kao egzogeni antioksidansi štite tijelo od slobodnih radikala koji su uzrok oksidativnog stresa i inhibiraju oksidaciju LDL kolesterola koja omogućava aterosklerozu.

Stanični efekti ROS-a oslanjaju se na razine stanične izloženosti. Izloženost stanice niskim do umjerenim razinama ROS-a dovodi do pojačane funkcije antioksidativnih hvatača za reaktivne kisikove spojeve i izaziva citozaštitni učinak (11). Izloženost velikoj razini ROS-a uključuje TNF α , IL6, IL8 kao protuupalni odgovor i dolazi do pojave promotora oksidativnog stresa. Redoks-reakcije posredovane ROS-om uzrokuju gubitak elektrona u ciljnoj molekuli koja zatim mijenja svoju strukturu i funkciju. Zbog spomenutih utjecaja ROS-a na organizam, vrlo je bitno da je proizvodnja ROS-a pravilno regulirana kako bi se omogućio pravilni popravka oštećenja tkiva te ispravna homeostaza (8, 12). Dakle, različiti mehanizmi štite organizam od radikala od kojih antioksidacijska zaštita biomolekula potječe iz više različitih izvora.

Superoksidni radikal nastaje fiziološki i slučajno jer je kao reaktivni kisikov radikal potreban za nekoliko enzimski kataliziranih reakcija. Superoksid dismutaze kataliziraju reakcije između superoksidnog radikala i vode, pri čemu nastaju kisik i vodikov peroksid dok katalaze uklanjaju taj isti vodikov peroksid. Lipide u membranama oštećuju radikali stvarajući lipidne peroksidge koji se preko glutathion peroksidaze reduciraju u masne kiseline, dok se oksidirani

glutation reducira preko NADPH-glutation reduktaze. Reakcijom s vitaminom E, lipidni se peroksidi također mogu reducirati i na masne kiseline.

Dok je s oksidacijom glutatona povezana enzimska redukcija lipidnih peroksida, neenzimska je reakcija lipidnih peroksida povezana s vitaminom E. Beta karoten može biti antioksidans jedino pri niskom parcijalnom tlaku kisika, dok je pri povišenom autokatalitički prooksidans, a vitamin E stvara stabilni radikal koji reagira s vodotopljivim antioksidansima i može prodrijeti u tkiva i u lipoproteine te povećati oštećenje izazvano radikalima (3, 8, 12).

1.3 Hiperbarična oksigenacija

Prilikom spuštanja u dubine mora tlak se oko čovjeka veoma povećava pa se tako zrak za napuhavanje pluća mora dovoditi pod vrlo visokim tlakom da pluća ne bi kolabirala. „Hiperbarizam“ je pojava pri kojoj se krv u plućima izlaže iznimno visokim alveolarnim tlakom te kada se prođu određene granice ti visoki tlakovi mogu uzrokovati velike promjene tjelesnih funkcija, a mogu biti i smrtonosni (13). Čovjek će na dubini od 10 m pod morskom površinom biti izložen tlaku od 202,6 kPa, od čega 101,3 kPa zbog težine zraka iznad vode i 101,3 kPa zbog težine same vode. Kada je tlak kisika u krvi viši od 13 kPa povećava se količina otopljenog kisika u tekućoj fazi krvi te samo udisanje kisika pod visokom alveolarnim tlakom veoma je štetno za mnoga tkiva u organizmu. Izlaganje kisiku pod tlakom od 400 kPa izaziva epileptične napadaje nakon kojih osoba pada u komu (13).

Za povećanje količine kisika u krvi ne postoji lijek. Jedini za sada poznati način utemeljen na povećanju količine kisika otopljenog u krvi pri tlaku hiperbarična je oksigenacija (HBOT). Temelj terapije hiperbaričnom oksigenacijom (engl. *Hyperbaric oxygen treatment*, HBO₂) liječenje je povećanjem količine kisika u krvi pri tlaku od 100 kPa (1,0 bara). Bolesnici udišu 100 %-tni kisik u posebno konstruiranoj komori. Frakcija slobodnog kisika u plazmi se povećava kada se udahne kisik pod povišenim tlakom. Udisanjem hiperbaričnog kisika dobijemo i do 20 puta više kisika otopljenog u krvi nego udisanjem zraka (proces normalnog disanja) ili tri do četiri puta više nego udisanjem kisika pri normalnom tlaku. Nakon što se pacijent stavi u atmosferu 100 %-tnog kisika pod visokim tlakom njegov hemoglobin postaje u potpunosti zasićen kisikom. Krv se može i hiperoksigenirati te primiti još više kisika jer se pod takvim tlakom kisik bolje otapa u krvnoj plazmi (Henryjev zakon). Takva krv donosi više kisika povrijeđenim tkivima, što utječe na različite načine na ublažavanje bolesti. Prilikom

difuzije kisika otopljenog u krvi prema tkivima, velikom brzinom se ispravlja lokalna ili opća hipoksija (nedostatak kisika u tkivima) (14, 15).

U fiziološke učinke hiperbarične oksigenacije ubrajamo:

1. povećavanje količine kisika u stanicama s obzirom na fizikalno otopljen kisik u plazmi čime se korigira hipoksija i smanjuje upalna reakcija tkiva,
2. poboljšavanje cirkulacije krvi, smanjenje gustoće plazme, povećavanje elastičnosti opne crvenih krvnih zrnaca, smanjenje ljepljivosti krvnih pločica i bijelih krvnih stanica te ubrzanje stvaranja mreže novih krvnih kapilara,
3. odstranjenje plinskih mjehurića iz organizma, što je iznimna važnost kod ronilaca i plinske embolije,
4. povećanje obrambene sposobnosti organizma zbog povećavanja sposobnosti bijelih krvnih stanica, zaustavlja rast bakterija i ubija ih,
5. povećanje osjetljivosti stanica zloćudnih tumora na zračenje,
6. ubrzavanje zarastanja kostiju.

Hiperbarična komora tehnološki je sofisticiran medicinski uređaj koji osigurava ljudima boravak u sredini povišenog ili sniženog tlaka u odnosu na normalni atmosferski tlak od jednog bara. Hiperbarična komora zapravo je "simulator ronjenja", samo što umjesto vode njezinu unutrašnjost ispunjava plin. Danas u svijetu postoji preko 20.000 hiperbaričnih komora različitih namjena (16). Kada se tlak udahnutog kisika poveća za 100 kPa u 100 mL krvi u organizam se dopremi oko 2,4 mL kisika. Na taj način fizikalno otopljeni kisik zaobilazi eritrocitnu membranu i brže difundira u tkivo. Udisanjem zraka pri normalnom tlaku zasićenost hemoglobina kisikom iznosi 97 %. U 100 mL krvi ima 19,5 % kisika koji je kemijski vezan i 0,32 % otopljenog u plazmi. Ukoliko se udiše 100 %-tni kisik pri normalnom tlaku u plazmi se otapa 2,09 %, a pri udisanju kisika u hiperbaričnim uvjetima pri tlaku od tri bara, postotak otopljenog kisika u plazmi raste na 6,2 % i ta je količina kisika jednaka onoj količini koju tkiva u mirovanju troše između arterijskog i venskog dijela kapilara. Pri tome, kisik otopljen u plazmi dopire i do najudaljenijih stanica za razliku od eritrocita, kao glavnih nositelja kisika pri normalnom disanju, a koji zbog svoje veličine i neelastičnosti nemaju tu sposobnost. Stoga za terapiju HBO koristi se primjena tlaka do 3,0 bara te je dokazano da je HBO terapija sigurna za pacijente i da su nuspojave rijetke kada se tretman provodi pri pritisku tlaka manjem od 3,0 bara (14, 15, 16).

2. HIPOTEZA

Akutna hiperbarična oksigenacija uzrokuje povećanu razinu oksidativnog stresa, mjerljivu metodama mjerenja oksidativnog stresa (TBARS) i antioksidativnog kapaciteta (FRAP).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je:

1) odrediti djelovanje akutne hiperbarične oksigenacije na parametre oksidativnog stresa u serumu pokusnih životinja (štakori soja Sprague-Dawley) pomoću standardiziranih protokola spektrofotometrijskim metodama.

4. MATERIJELI I METODE

4.1 Eksperimentalni životinjski model

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije te u Laboratoriju za kliničku i molekularnu imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Korišten je ukupan broj od 13 Sprague-Dawley (SD) muških štakora u dobi od 9-11 tjedana starosti. Svi su štakori iz vlastitog uzgoja Vivarija pri Medicinskom fakultetu u Osijeku.

Štakori su bili podijeljeni u dvije skupine: skupina 1 (KONTROLA, CTRL) – zdravih sedam netretiranih štakora, skupina 2 (A-HBO₂) - šest štakora izloženih akutnom djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori, žrtvovani odmah po izlaganju (Rekompresijska komora za eksperimente 110 L, Đuro Đaković, Aparati d.d.).

4.2 Protokoli za izlaganje hiperbaričnom kisiku

Nakon smještaja životinja u barokomoru slijedi 15 minuta kompresije na 2,0 atm otvaranjem kompresijskog ventila (dekompresijski je ventil pri tome zatvoren) i puštanjem kisika u komoru. Kad se postigne tlak od 2,0 atm, zatvori se kompresijski ventil te su štakori izloženi djelovanju 100 %-tnog kisika u trajanju od 2 sata uz protok 2-3 l/min. Za vrijeme trajanja terapije zajedno sa štakorima u komori je smještena i mala količina granula kalcij-hidroksida i natrij-hidroksida te etilvioleta (Draegersorb 800 Plus, DraegerMedical) za upijanje izdahnutog CO₂. Slijedi 15 minuta dekompresije otpuštanjem dekompresijskog ventila.

4.3 Mjerenje krvnoga tlaka

Štakori su anestezirani kombinacijom ketamina (75 mg/kg) i midazolama (2,5 mg/kg). PE-50 kateter uveli smo u lijevu femoralnu arteriju. Ostavljeni su 10 minuta dok se krvni tlak stabilizirao, a nakon toga je krvni tlak mjeren tijekom 1 minute i zapisivana je vrijednost tlaka svakih 10 sekundi. Svi su rezultati prikazani kao aritmetička sredina i standardna pogreška aritmetičke sredine. Vrijednosti tlaka mjerene su pomoću SpacelabsMedical sustava (SpacelabsMedical, Inc., Redmond, WA, USA) (16). Srednji je arterijski tlak izračunat iz dobivenih vrijednosti kao zbroj sistoličkog i dvostrukog dijastoličkog tlaka te podijeljen s tri. Kao kontrolne vrijednosti tlaku uzete su vrijednosti izmjerene kod životinja A-HBO₂ neposredno prije izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Kateter je po završetku mjerenja potkožno provučen do vratnog dijela životinje i zatvoren na tom kraju. Nakon dekompresije, životinje su po potrebi dodatno anestezirane i ponovljeno je mjerenje tlaka (A-HBO₂).

4.4 Skupljanje arterijskih uzoraka krvi

Nakon izmjerenog krvnog tlaka kroz kateter je uzet uzorak arterijske krvi u epruvetu bez antikoagulansa kako bismo dobili uzorak seruma. Krv je centrifugirana 10 min na 3500 rpm te je potom odvojen serum od krvnih stanica i pohranjen u hladnjaku na -80 °C do upotrebe u svrhu određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta.

4.5 Mjerenje oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta

Mjerenje oksidativnog stresa napravljeno je na uzorcima krvi (serum) štakora dvama biokemijskim metodama. Prva je metoda (engl: *thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)*) temeljena na reakciji između malondialdehida (koji je krajnji produkt peroksidacije lipida) i tiobarbituratne kiseline. Spoj malondialdehida i tiobarbituratne kiseline ima absorbanciju na 532 nm što se mjeri putem UV- spektrofotometra (NanoPhotometer® P-Class P330-30, Implen, Germany). Druga je metoda mjerenje antioksidativnog kapaciteta plazme koja se mjeri putem tzv. *Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay* (eng.) pri čemu se događa redukcija Fe^{3+} u Fe^{2+} te nastaje kompleks koji ima absorbanciju na 593 nm, što se također mjeri spektrofotometrom (17).

4.6 Statističke metode

Svi su rezultati prikazani kao aritmetička sredina i standardna pogreška aritmetičke sredine. Kod pojedinih rezultata utvrđivanja međusobne razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih grupa koristio se Studentov t-test, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U test. Za statističku je analizu upotrebljen SigmaPlot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago, USA) i GraphPadInstat i GraphPadPrism, verzija 5.00 za Windows, GrafPad Software (San Diego, CA, USA).

5. REZULTATI

5.1 Masa štakora i srednji arterijski tlak

U studiju su bili uključeni zdravi, normotenzivni muški Sprague-Dawley štakori u starosti od 9 do 11 tjedana. Svakoj je životinji mjerena tjelesna masa te krvni tlak. Nisu utvrđene značajne razlike u tjelesnoj masi štakora. Akutno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji statistički značajno uzrokuje sniženje krvnog tlaka u usporedbi s kontrolom skupinom.

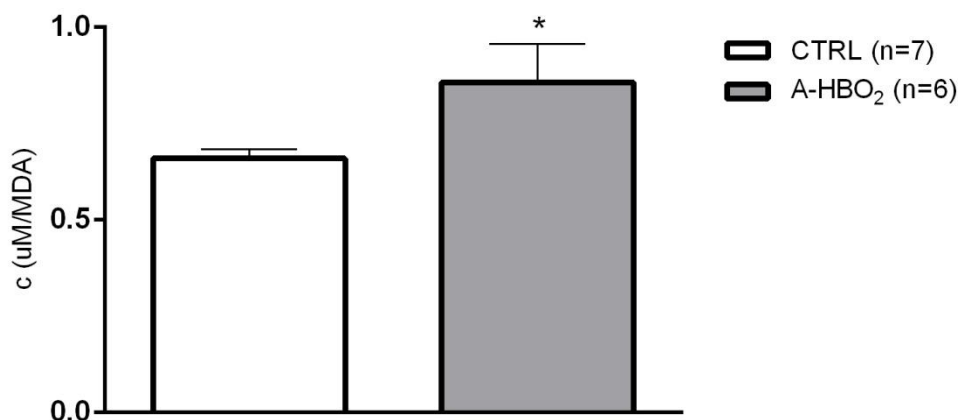
Tablica 1. Vrijednosti tjelesne mase i krvnog tlaka u testiranim grupama štakora

	CTRL	A-HBO ₂
Sistolički	133,67±1,28	98,33±1,41*
Dijastolički	93,65±1,81	75,99±3,65*
Srednji arterijski tlak	106,99±1,49	83,21±2,39*
Masa [g]	338,11±8,66	336,33±8,79

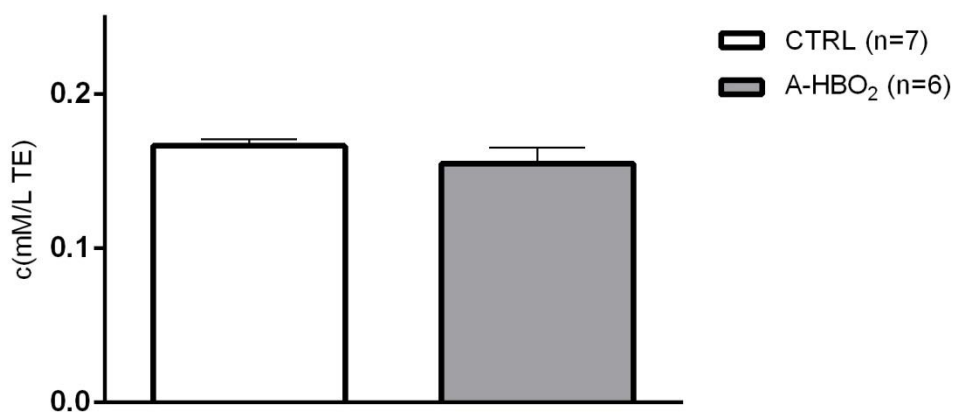
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna pogreška aritmetičke sredine
p<0,05 u odnosu na CTRL i A-HBO₂

5.2. Razina oksidativnog stresa (TBARS) i antioksidativni kapacitet (FRAP) u serumu

U skupini A-HBO₂ utvrđena je značajno veća razina oksidativnog stresa u serumu, u odnosu na CTRL skupinu. Antioksidativni kapacitet između ispitanih skupina nije se značajno promijenio (Slika 1. i 2.).



Slika 1. Serumska razina oksidativnog stresa (TBARS) izmjenog iz uzoraka arterijske krvi. A-HBO₂ skupina ima povećani oksidativni stres u odnosu na kontrolnu CTRL skupinu. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna pogreška aritmetičke sredine; * $p < 0,05$ u usporedbi sa CTRL.



Slika 2. Serumska razina antioksidativnog kapaciteta (FRAP) izmjenog iz uzoraka arterijske krvi. U antioksidativnom kapacitetu nisu primijećene razlike između skupina. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna pogreška aritmetičke sredine.

6. RASPRAVA

Kisik je neophodan za svaki organizam, dok s druge strane može biti i vrlo štetan. Kako je kisik iznimno reaktivna molekula, pod njegovim utjecajem može doći do promjene proizvodnje metaboličkih produkata, kao i povećane razine različitih enzima. Dosadašnja istraživanja pokazala su različite učinke hiperbarične oksigenacije ovisno o primijenjenom protokolu i dužini izlaganja.

Prikazana studija ispituje utjecaj akutne hiperbarične oksigenacije na parametre oksidativnog stresa kod zdravih muških Sprague Dawley štakora. U prvoj su skupini bili zdravi netretirani štakori (CTRL), dok su u drugoj skupini štakori izloženi djelovanju akutne hiperbarične oksigenacije (A-HBO₂). Mjerenje oksidativnog stresa napravljeno je prema standardiziranim protokolima na uzorcima krvi (serum) uz pomoć dviju prethodno opisanih biokemijskih metoda (TBARS i FRAP) te je glavna spoznaja studije ta da akutno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji podiže razinu oksidativnog stresa izmjerenog u krvi izloženih životinja. U skupini A-HBO₂ utvrđena je značajno veća razina oksidativnog stresa u serumu, u odnosu na kontrolnu skupinu, što potvrđuje hipotezu postavljenu na početku ovoga istraživanja. Nadalje, antioksidativni se kapacitet između ispitanih skupina nije statistički značajno promijenio.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s ranije prikazanim studijama koje ispituju utjecaj hiperbarične oksigenacije na vaskularnu funkciju, a prikazuju smanjen vaskularni odgovor nakon akutnog tretmana hiperbaričnim kisikom (16, 18). Nedavna studija iz našeg laboratorija na dijabetičnim štakorima pokazala je značajno povećanu razinu oksidativnog stresa nakon akutnog izlaganja hiperbaričnom kisiku (16) te smo u ovom istraživanju htjeli vidjeti razinu oksidativnog stresa kod zdravih životinja. Rezultati naše studije u skladu su s prethodno navedenim istraživanjem.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata i provedenog istraživanja mogu se izvesti zaključci:

- akutna hiperbarična oksigenacija značajno snižava razinu krvnog tlaka kod SD štakora,
- akutna hiperbarična oksigenacija podiže razinu oksidativnog stresa izmjenjenog u krvi izloženih životinja.
- akutna hiperbarična oksigenacija ne utječe značajno na masu štakora,

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: cilj ovog istraživanja odrediti je utjecaj akutne hiperbarične oksigenacije na parametre oksidativnog stresa u zdravih Sprague-Dawley štakora.

Materijali i metode: zdravi, muški štakori u dobi od 9 do 11 tjedana starosti podijeljeni su u dvije skupine: CTRL, kontrolnu skupinu (zdravi netretirani štakori) te A-HBO₂ skupinu (štakori izloženi akutnom djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori (100 %-tni kisik; 2 bar/2 sata). Štakori su anestetizirani kombinacijom ketamina (75 mg/kg) i midazolama (2,5 mg/kg). Uzeti su uzorci krvi iz kojih su mjereni indikatori oksidativnog stresa, metodama TBARS i FRAP. Svakoj je životinji također mjerena tjelesna masa te krvni tlak.

Rezultati: nisu utvrđene značajne razlike u tjelesnoj masi štakora, dok je krvni tlak bio značajno snižen u A-HBO₂ skupini uspoređujući s kontrolnom skupinom. TBARS značajno je povećan u A-HBO₂ skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom, dok se antioksidativni kapacitet između ispitivanih grupa nije značajno promijenio.

Zaključak: akutna hiperbarična oksigenacija podiže razinu oksidativnog stresa kod zdravih Sprague-Dawley štakora.

Ključne riječi: štakor, hiperbarična oksigenacija, oksidativni stres, TBARS, FRAP.

9. SUMMARY

Influence of acute hyperbaric oxygenation on oxidative stress parameters in healthy Sprague - Dawley rats

Aim: The aim of this research is to determine the effect of acute hyperbaric oxygenation on oxidative stress parameters in healthy Sprague-Dawley rats.

Materials and methods: Healthy male rats aged 9-11 weeks of age were divided into two groups: CTRL, control group (healthy untreated rats) and A-HBO2 group (rats exposed to hyperbaric oxygen in hyperbaric chamber (100% oxygen, 2 bar / 2 hours). The rats were anesthetized by a combination of ketamine (75 mg / kg) and midazolam (2.5 mg / kg). Blood samples were taken, in which the oxidative stress indicators were measured, using TBARS and FRAP methods. Also, body mass and blood pressure were measured in each animal.

Results: There weren't significant differences in the body weight of the rat, while blood pressure was significantly reduced in the A-HBO2 group compared to the control group. TBARS was significantly increased in the A-HBO2 group compared to the control group, while the antioxidant capacity among the investigated groups did not significantly change.

Conclusion: Acute exposure to hyperbaric oxygenation increases oxidative stress in healthy Sprague-Dawley rats.

Key words: rats, hyperbaric oxygenation, oxidative stress, TBARS, FRAP

10. LITERATURA

1. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *Journal of applied physiology*. 2009;106(3):988-95.
2. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49:3-8.
3. Harper: Slobodni radikali i antioksidacijske hranjive tvari, in: Harperova ilustrirana biokemija, urednice: Jasna Lovrić, Jadranka Sertić, 2011., Medicinska naklada, Zagreb, (482-486)
4. Ćosić A, Novak S, Jukić I, Stupin A, Mihaljević Z, Rašić L, i sur. Primjena laboratorijskih metoda u dijagnosticiranju oksidativnog stresa na primjeru animalnog modela prekomjernog unosa soli. *Cardiol Croat*. 2017;12:78.
5. Štefan L, Tepšić T, Zaviđić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R, Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* 2007;43:84-93.
6. Steven L. Nissen and Rick L. Sharp: Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis, *J Appl Physiol*, Feb 2003; 94: 651 – 659
7. Lončar V. (2015.) Nastajanje i izlučivanje slobodnih radikala kod životinja pri stresnim uvjetima. Završni rad. Osijek: Poljoprivredni fakultet (zootehnika)
8. Knez M. (2014.) Antioksidansi. Završni rad. Osijek: Odjel za kemiju
9. N. Chandra, V. Lobo, A. Patil, A. Phatak: Free radicals, antioxidants and functional foods-impact on human health, 2010., *Pharmacognosy Reviews*, 4 (118-126)
10. Ćosić A. (2016.) Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora pod utjecajem visokog unosa natrijeva klorida kod Sprague-Dawley štakora. Doktorska disertacija. Osijek: Medicinski fakultet
11. Sudjit Luanpitpong, Pithi Chanvorachote, Ubonthip Nimmannit, Stephen S. Leonard ,Christian Stehlik , Liying Wang: Mitochondrial superoxide mediates doxorubicin-

induced keratinocyte apoptosis through oxidative modification of ERK and Bcl-2 ubiquitination, *Biochemical Pharmacology*; 83 (2012)

12. Zhou D, Shao L, Spitz RD. Reactive Oxygen Species in normal and tumor stem cells. *Adv Cancer Res.* 2014;122: 1-67.
13. Guyton: Fiziološki problemi pri dubinskom ronjenju i u ostalom uvjetima visokog tlaka, in: Guyton I Hall : Medicinska fiziologija , urednici: Sunčana Kukolja Taradi, Igor Andreis, 2006, Medicinska naklada, Zagreb
14. Bilić I, Petri NM. Hiperbarična oksigenacija u liječenju infekcija središnjeg živčanog sustava. *Infektološki glasnik.* 2013;33:4,177-181.
15. Thom SR. Hyperbaric oxygen – its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127:131-141.
16. Drenjancevic I, Kibel A, Kibel D, Seric V, Cosic A. Blood pressure, acid-base and blood gas status and indicators of oxidative stress in healthy male rats exposed to acute hyperbaric oxygenation. *Undersea Hyperb Med.* 2013;40:319-28
17. Ćosić A, Jukić I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljević Z, Novak S, Vuković R, Drenjančević I. Attenuated flow-induced dilation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol* 000.0 (2016) pp 1–15.
18. Hink J, Thom SR, Simonsen U, Rubin I, Jansen E. Vascular reactivity and endothelial NOS activity in rat thoracic aorta during and after hyperbaric oxygen exposure. *Am J PhysiolHeartCircPhysiol.* 2006 Oct;291(4):H1988-98. Epub 2006 Apr 28

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Antonio Vrselja

Datum i mjesto rođenja: 10.04.1993. , Đakovo, Republika Hrvatska

Adresa: Antun Mihanović 8, 32100 Vinkovci

Telefon: 099/823 25 92

E-mail: avrselja23@gmail.com

Obrazovanje:

2008. – 2012. Gimnazija Vinkovci

2012. –2018. Medicinski fakultet Osijek – Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike